

Rapport de mission en Côte d'Ivoire
P. BESSE - M. SEGUIN
du 25.07.90 au 11.08.90



Institut de Recherches sur le Caoutchouc

Département du Centre de Coopération Internationale
en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD)
42, rue Scheffer 75116 Paris (France) - Tél. : (1) 47.04.32.15

Télex : 620871 INFRANCA PARIS

RAPPORT DE MISSION EN COTE D'IVOIRE

P. BESSE – M. SEGUIN

du 25.07.90 au 11.08.90

SOMMAIRE

INTRODUCTION	1
1. BUTS DE LA MISSION	1
1.1. MISSION DE COLLABORATION	1
1.2. MISSION TECHNIQUE	1
1.3. MISSION D'INFORMATION	1
1.4. PHOTOGRAPHIES	1
2. PROGRAMME DE LA MISSION	1
2.1. PROGRAMME DES VISITES	1
2.2. PROGRAMME DES REUNIONS	2
2.3. MANIPULATIONS - PHOTOS	2
2.4. TRAJETS	2
COMPTE-RENDU	2
1. COLLABORATION AVEC L'EQUIPE AMELIORATION DE L'IRCA COTE D'IVOIRE	3
1.1. PRESENTATION DU PROGRAMME IRCA-AGETROP	3
1.1.1. Isozymes	3
1.1.2. RFLP	3
1.2. MISE AU POINT DE PROTOCOLES EXPERIMENTAUX	4
1.2.1. Contrôle de conformité clonale	4
1.2.2. Jardin expérimental de pollinisation libre	5
1.2.3. Cartographie du génome par RFLP	9
1.3. TRANSFERT DE TECHNOLOGIE VERS L'IRCA COTE D'IVOIRE	10
1.3.1. Intérêt	10
1.3.2. Difficultés	10
1.3.3. Visite du laboratoire électrophorèse de l'IRCC à Bingerville	10
1.3.4. Autres possibilités	11
2. MISE AU POINT DU PROTOCOLE DE SECHAGE DES FEUILLES POUR LES RFLP	12
2.1. PRELEVEMENT - PROTOCOLE	12
2.2. EXPERIENCES	14
2.3. RESULTATS - DISCUSSION	16
2.3.1. Etat des feuilles prélevées	16
2.3.2. Paramètres n'influençant pas la qualité des feuilles ni de l'ADN	16
2.3.3. Paramètres n'influençant pas la qualité des feuilles mais induisant une dégradation de l'ADN	16

2.3.4. Paramètres entraînant brunissement des feuilles et dégradation ADN	17
2.4. CONCLUSION	17
3. VISITE DES AUTRES LABORATOIRES IRCA	17
3.1. PHYSIOLOGIE	17
3.2. TECHNOLOGIE	19
3.3. PHYTOTECNIE	20
CONCLUSION - REMERCIEMENTS	21
ANNEXES	22

* *
*

INTRODUCTION

1. BUTS DE LA MISSION

1.1. MISSION DE COLLABORATION

L'objectif, très important pour nous, était de pouvoir discuter avec l'équipe de l'Amélioration Génétique (A. Clément-Demange, H. Legnate, M. Gnagne), afin d'organiser les collaborations entre les programmes de l'Amélioration et de l'IRCA-AGETROP à Montpellier.

1.2. MISSION TECHNIQUE

Le deuxième but était la mise au point d'un protocole, simple et sûr, du séchage des feuilles d'hévéa ; les extractions d'ADN à Montpellier se font sur feuilles séchées. Parallèlement, nous souhaitons rapporter suffisamment de matériel (feuilles séchées de clones différents) pour que P. Besse ne soit pas bloquée au cours de sa thèse.

1.3. MISSION D'INFORMATION

Pour ce premier séjour à l'IRCA Côte d'Ivoire, nous devons faire la connaissance des chercheurs et découvrir les programmes des différents services : Amélioration, Physiologie, Phytotechnie et Technologie.

1.4. PHOTOGRAPHIES

Une quatrième mission nous a également été confiée : réaliser des photographies de saigneurs ou en rapport avec le Diagnostic Latex, pour la couverture de la future plaquette de présentation de l'IRCA.

2. PROGRAMME DE LA MISSION

2.1. PROGRAMME DES VISITES

- | | |
|------------|---|
| 25 juillet | Visite de la plantation, pépinières, jardins à bois.
Présentation générale du programme Amélioration (A. Clément-Demange). |
| 30 juillet | Visite du laboratoire d'électrophorèse de l'IRCC Bingerville (O. Sounigo, E. Liade) et visite des parcelles d'expérimentation cacao avec A. Clément-Demange, M. Gnagne et H. Legnate. |
| 31 juillet | Visite des serres d'acclimation des microboutures et de la pépinière avec C. Drenou. |
| 1er août | Visite des expérimentations Physiologie sur la plantation avec R. Lacrotte.
Visite du laboratoire de Physiologie avec E. Serres. |
| 2 août | Visite des expérimentations Phytotechnie sur la plantation avec J. Kéli et M. Kouassi.
Visite des laboratoires de Technologie avec J.C. Laigneau, A. Lemoine et P. Steiner. |
| 6 août | Visite des laboratoires de Spécification avec M. Sylla. |

7/8 août Suivi de l'usinage avec P. Steiner.

2.2. PROGRAMME DES REUNIONS

- 25 juillet Réunion préliminaire sur les relations IRCA Côte d'Ivoire - AGETROP avec A. Clément-Demange.
- 26 juillet Réunion relations IRCA Côte d'Ivoire - AGETROP : isozymes, RFLP ; avec A. Clément-Demange, H. Legnate et M. Gagne. Exposé des travaux réalisés à Montpellier.
- 30 juillet Réunion sur le thème "pollinisation libre" avec A. Clément-Demange, H. Legnate et M. Gagne.
- 2 août Discussion sur la mise en place d'un dispositif de pollinisation libre avec l'équipe Amélioration.
- 8 août Bilan sur les demandes de l'IRCA Côte d'Ivoire au niveau de l'électrophorèse avec A. Clément-Demange.
Visite des jardins à bois de diffusion. Essais d'identification morphologique et réflexion sur les besoins d'identification par électrophorèse avec A. Clément-Demange.

2.3. MANIPULATIONS - PHOTOS

- 26 juillet Photos en plantation pour plaquette IRCA.
- 27 juillet Photos en plantation.
1er prélèvement de feuilles et séchage avec M. Mobio.
- 31 juillet Photos en plantation.
2e prélèvement de feuilles et séchage avec M. Mobio.
- 3 août 3e prélèvement de feuilles et séchage avec M. Mobio.
- 7 août 4e prélèvement de feuilles et séchage avec M. Mobio.

2.4. TRAJETS

Marc SEGUIN

- 20 juillet Montpellier-Paris
24-25 juillet Paris-Abidjan
10-11 août Abidjan-Paris
13 août Paris-Montpellier

Pascale BESSE

- 24-25 juillet Montpellier-Paris-Abidjan
10-11 août Abidjan-Paris-Montpellier

COMPTE-RENDU

1. COLLABORATION AVEC L'EQUIPE AMELIORATION DE L'IRCA COTE D'IVOIRE

1.1. PRESENTATION DU PROGRAMME IRCA-AGETROP

Nous avons fourni à A. Clément-Demange le programme de travail RFLP établi en collaboration avec Claire Lanaud, lequel peut se résumer comme suit :

	P. BESSE	M. SEGUIN
1990	Identification clonale Wickham	
1991	Réalisation d'une banque nucléaire d'hévéa Tri des sondes	
1992	Etude diversité Wickham (+ amazoniens)	Etude ségrégation marqueurs RFLP

Nous avons présenté le programme de recherche du laboratoire IRCA-AGETROP à A. Clément-Demange, M. Gnagne et H. Legnate.

1.1.1. Isozymes

Par cette technique, les activités s'organisent sur deux axes : (1) maintien des activités d'électrophorèse d'isozymes dans des projets de recherche : identification clonale, pollinisation libre... (2) recherche d'une structure de service à mettre en place pour valoriser l'outil "isozymes" mis au point par M.H. Chevallier et P. Lebrun, et pour répondre aux besoins d'identification clonale de la Côte d'Ivoire.

La discussion a porté sur l'étendue des besoins en contrôle et expérimentation par isozymes et sur la disponibilité d'AGETROP pour y répondre. Deux thèmes principaux de recherche intéressent conjointement les deux équipes :

- caractérisation des clones : extension de la base de données d'identification par isozymes ;

pollinisation libre mise en place d'un dispositif d'étude expérimental.

Par contre, la disponibilité d'AGETROP ne permet pas de répondre aux besoins du contrôle de conformité de la totalité des jardins à bois. Ces questions ont été approfondies au cours de discussions ultérieures (voir 1.2.).

1.1.2. RFLP

- Cartographie : projet de construction d'une banque génomique d'ADN nucléaire, devant fournir les sondes homologues pour l'identification clonale et à la cartographie du génome de l'hévéa.

La seconde partie du programme AGETROP : marquage des caractères d'intérêt agronomique intéresse vivement le service Amélioration Génétique. La réalisation de ce projet nécessite une étroite

collaboration entre les deux équipes, les expérimentations devant être réalisées en parallèle, au laboratoire et en plantation (voir 1.2.3.).

- **Identification et étude de diversité** : présentation des techniques RFLP (voir annexes).
 - 1 généralités,
 - 2 résultats sur l'hévéa,
 - 3 qualité de l'ADN selon l'état des feuilles.

L'identification par les RFLP intéresse la Côte d'Ivoire au même titre que les isozymes (vérifications, contrôle pollinisation...), d'autant que les possibilités d'identification des clones IRCA risquent, à terme, d'être limitées si l'on se restreint à la seule utilisation des isozymes (le nombre de marqueurs RFLP est à priori illimité). Les marqueurs RFLP seraient, de plus, idéaux pour réaliser l'inscription des clones IRCA au catalogue.

A. Clément-Demange serait intéressé par des résultats complémentaires aux isozymes concernant la diversité des amazoniens, c'est à dire savoir s'il est possible, grâce aux marqueurs RFLP, d'affiner la différenciation des différents groupes déjà révélés par les isozymes. Ces renseignements pourront certainement être donnés d'ici 1995, date à laquelle les études de diversité seront utilisées pour des schémas de croisement.

- **Matériel végétal** : d'après A. Clément-Demange, il serait utile que les demandes d'échantillons effectuées par Montpellier soient notées :

MS pour Marc SEGUIN
PB pour Pascale BESSE

et facturées séparément pour Paris.

Prévision demandes en matériel végétal pour P. Besse : le matériel prélevé lors de cette mission (soit les 66 clones Wickham de génotype connu par les isozymes, 3 feuilles par clone) devrait suffire pour effectuer les études d'identification. Ainsi, il y aurait au maximum à réaliser :

- 1 un autre prélèvement des 66 clones Wickham pour l'étude de diversité ;
- 2 un autre prélèvement des clones Wickham prochainement identifiés par isozymes ;
- 3 un prélèvement des prospections amazoniennes non disponibles en serre à Montpellier.

D'après A. Clément-Demange, ces prélèvements ne semblent pas présenter une surcharge trop importante pour l'IRCA Côte d'Ivoire.

1.2. MISE AU POINT DE PROTOCOLES EXPERIMENTAUX

1.2.1. Contrôle de conformité clonale

Le service Amélioration de Côte d'Ivoire, souhaiterait réaliser le contrôle de conformité clonale, par isozymes, sur l'ensemble des jardins à bois de la plantation de Bimbresso.

Il n'est pas possible d'analyser toutes les souches d'hévéa en jardin à bois, ni même des échantillons importants de toutes les parcelles.

Au cours de plusieurs réunions, les discussions ont porté sur, d'une part, les contrôles à effectuer en priorité et, d'autre part, sur la méthode d'échantillonnage à employer.

- Identification des clones

En premier lieu, il est nécessaire d'identifier, de caractériser par isozyms, tous les clones intéressants en sélection et non encore identifiés, en complément de ceux répertoriés par M.H. Chevallier : A. Clément-Demange a dressé la liste de 44 clones IRCA et 24 clones non IRCA à identifier (tableau 1).

L'analyse, par électrophorèse, de ces clones est en cours à Montpellier. Pour garantir la validité de l'identification de référence des clones, on analysera trois individus par clone.

- Echantillonnage

En priorité, 100 parcelles de jardins à bois méritent d'être contrôlées. Ces parcelles correspondent aux 15-20 clones les plus importants.

Premier niveau d'échantillonnage : il consistera à prélever un individu pour chacune des 100 parcelles, afin d'estimer la validité globale des jardins à bois.

Deuxième niveau d'échantillonnage : le taux d'impureté éventuellement observé aura une valeur statistique ; cependant, pour les parcelles trouvées impures après le premier échantillonnage, il sera intéressant de connaître le taux d'impuretés intra-parcelle. Suivant le nombre de parcelles en cause, 10 individus, ou plus, seront analysés par électrophorèse. Leur nombre total sera limité à 100 individus.

Troisième niveau d'échantillonnage pour le clone GT 1 : 50 parcelles seront contrôlées à 1 individu par parcelle ; et pour une des parcelles, un échantillon de 50 individus sera analysé.

Au total, le nombre minimum de contrôles de conformité des jardins à bois de diffusion, pour la Côte d'Ivoire, est de 504 analyses par isozyms : 204 pour l'identification clonale, 200 pour l'ensemble des jardins et 100 pour le clone GT 1.

Ce dispositif est un modèle pour des analyses de conformité pouvant intéresser tout organisme de sélection.

Le nombre d'individus à analyser augmente très rapidement lorsque l'on souhaite effectuer des contrôles précis. Nous avons cherché, ici, à définir le dispositif minimum susceptible de fournir une première mesure significative de la qualité globale de jardins à bois.

1.2.2. Jardin expérimental de pollinisation libre

Un projet d'amélioration de l'hévéa dans un schéma de type sélection récurrente, prévoit la mise en place de jardins de pollinisation libre à l'IRCA. Ces jardins seront des populations d'individus de clones cultivés et amazoniens. L'efficacité du brassage génétique dépend (1) du taux d'autogamie des clones, (2) de l'existence d'incompatibilités entre génotypes et (3) de la distance de propagation du pollen.

ORIGINE	NUMEROS
PB	255 / 280 / 310 / 311 / 312 / 314 / 324
RRIC	103
RRIM	712 / 728 / 729 / 802 / 803 / 805 / 806 / 809 / 926
BPM	24
PR	300 / 303 / 305 / 306
PC	10 / 28
IRCA	18 / 19 / 22 / 27 / 37 / 41 101 / 109 / 111 / 117 / 120 / 122 / 126 / 130 / 144 / 145 202 / 209 / 230 303 / 305 / 307 / 317 / 321 / 323 / 331 407 / 408 / 413 / 416 / 427 515 / 523 / 538 617 / 631 707 / 723 / 733 804 / 814 / 825 / 840 / 842

Tableau 1 : Liste des clones devant être identifiés en électrophorèse d'isoenzymes par le laboratoire AGETROP.

Ces trois points sont encore mal connus chez l'hévéa. On admet habituellement que l'*Hévéa brasiliensis* est à dominante allogame. Mais le taux d'allofécondation dépend certainement de la disponibilité en allopollen. Dans un jardin de pollinisation libre, planté en quinconce par exemple, chaque arbre est entouré de génotypes tous différents, dont 6 plus proches voisins équidistants. Dans ces conditions, l'allopollen ne devrait pas être en quantité limitante et il reste à déterminer (1) quel est le taux de fécondation par l'autopollen et (2) s'il existe des systèmes d'incompatibilité (morphologiques, physiologiques ou génétiques) conduisant à des croisements préférentiels avec certains des génotypes présents.

Il apparaît donc souhaitable, avant la mise en place de ces jardins de pollinisation libre, d'estimer le taux d'allofécondations potentiel dans un jardin expérimental.

Après discussion, nous avons retenu le dispositif suivant :

- 1 Nous avons sélectionné, dans la base d'identification clonale par isozymes (clones cultivés et prospections analysées par M.H. Chevallier), les combinaisons de systèmes enzymatiques fournissant le plus possible de génotypes homozygotes différents. Avec la combinaison des 3 systèmes : estérase, leucine aminopeptidase et shikimate déshydrogénase, on obtient 19 génotypes différents (tableau 2).
- 2 Dix-neuf arbres seront plantés en quinconce, avec un arbre par génotype. Pour certains des génotypes, il existe plusieurs clones disponibles qu'on pourra choisir, si l'information existe, en fonction de leur aptitude à la fructification et pour synchroniser la floraison. Les arbres seront plantés à basse densité (75 arbres/hectare, distance entre deux arbres : 12 m) afin de maximiser les risques d'autofécondation. Le dispositif sera placé dans un isolement, par exemple au coeur d'une plantation de palmier ou de cocotier.
- 3 Pour chaque descendant d'un arbre donné, il sera possible d'identifier le géniteur mâle parmi les 19 possibles :
 - si le taux d'autofécondation apparaît trop élevé, on ne pourra pas réaliser de jardins de pollinisation libre satisfaisants ;
 - si le taux d'allofécondation est élevé on pourra observer d'éventuels croisements préférentiels ;
 - si ce phénomène n'est pas important on pourra estimer l'influence de la distance d'éloignement des géniteurs. Il faut souligner que, pour un jardin de pollinisation libre suffisamment important, un brassage aléatoire avec les plus proches voisins peut être considéré comme satisfaisant.
- 4 Ce dispositif sera répété 3 fois, en 3 isolements. Pour alléger le travail, on étudiera la descendance de 3 des 19 arbres dont l'arbre central. Cent graines par arbre seront analysées (900 analyses au total). Les premières récoltes pourraient intervenir en 1998.

L'inconvénient de ce dispositif est qu'il ne tient pas compte de la variabilité intraclonale, probablement élevée en raison du porte-greffe non clonal. Mais, dans un dispositif avec plusieurs individus par clone, on confond les autofécondations avec les autocroisements entre

CLONES	LAP	EST	SKD	CLONES	LAP	EST	SKD	CLONES	LAP	EST	SKD
224 AC	22	11	33	354 MT	33	44	33	110 AC	66	11	22
297 AC	22	11	33	347 MT	33	66	33	311 AC	66	11	33
295 AC	22	11	33	344 MT	33	66	33	RO53	66	11	33
IAN45/717	22	11	33	351 MT	44	11	33	218 RO	66	11	33
PB 24	22	11	33	381 RO	44	11	33	396 RO	66	11	33
OY 1	22	11	33	RRIC 4	44	11	33	62 AC	66	11	33
GT 1	22	11	33	PB 254	44	11	33	325 AC	66	11	33
188 RO	22	11	33	PR 107	44	11	33	45 AC	66	11	33
GU1296	22	11	33	3 AC	44	11	55	191 RO	66	11	33
FDR79	22	11	33	134 MT	44	44	33	17 AC	66	11	33
383 RO	22	11	33	127 MT	44	66	33	58 AC	66	11	33
77 AC	22	11	33	363 MT	44	66	33	205 RO	66	11	33
HARBEL 60	22	11	33	165 MT	44	66	33	184 RO	66	11	33
RRIM 607	22	11	33	159 MT	44	66	33	194 RO	66	11	33
29 AC	22	11	55	361 MT	44	66	33	329 AC	66	11	33
IAN6500	22	66	33	364 MT	44	66	33	91 AC	66	11	33
HARBEL 61	22	66	33	116 AC	66	11	55	282 AC	66	11	33
166 MT	22	66	33	398 RO	66	11	55	54 AC	66	11	33
RRIM 701	22	66	33	206 RO	66	11	55	186 RO	66	11	33
164 MT	22	66	33	RO60	66	11	55	207 RO	66	11	33
157 MT	22	66	33	10 AC	66	11	55	235 AC	66	11	33
RRIM 603	22	66	33	324 AC	66	11	66	42 AC	66	11	33
RRIM 707	22	66	33	399 RO	66	11	66	109 AC	66	11	33
TB 28	22	66	33	276 AC	66	11	66	392 RO	66	11	33
RRIM 612	22	66	33	112 AC	66	33	66	69 AC	66	11	33
PR 261	22	66	33	328 AC	66	44	33	232 AC	66	11	33
IR 35				140 MT	66	66	22	5 AC	66	11	33
				360 MT	66	66	33	334 AC	66	11	33
				147 MT	66	66	33	308 AC	66	11	33
				156 MT	66	66	33	MDF38	66	11	33
				F4506	66	66	44	387 RO	66	11	33
								391 RO	66	11	33
								55 AC	66	11	33
								AC74	66	11	33
								323 AC	66	11	33
								375 RO	66	11	33
								237 AC	66	11	33
								61 AC	66	11	33
								231 AC	66	11	33
								195 RO	66	11	33
								236 AC	66	11	33
								114 AC	66	11	33
								289 AC	66	11	44
								113 AC	66	11	44
								320 AC	66	11	44
								220 AC	66	11	44
								108 AC	66	11	44

Tableau 2 : Liste des clones correspondants aux 19 génotypes, pour les 3 systèmes enzymatiques Estérase (EST), Leucyl amino-peptidase (LAP) et Shikimate déshydrogénase (SKD).

individus du même clone. Ceci est surtout vrai si l'on utilise un dispositif constitué de parcelles monoclonales (en quinconce par exemple) au lieu d'individus. On peut cependant minimiser ce problème en recherchant une disposition où les individus d'un même clone soient le plus dispersés possible et de telle sorte que chaque individu ait tous les autres clones comme plus proches voisins. La réalisation d'un tel dispositif n'est pas triviale et est à l'étude.

1.2.3. Cartographie du génome par RFLP

Le matériel idéal pour réaliser une cartographie est une descendance d'un croisement entre deux parents, dont l'un au moins, est une lignée pure (homozygote à 100 %). A moins qu'il n'existe des lignées haploïdes doublées viables, il n'est pas envisageable de disposer de lignées pures chez l'hévéa.

On peut alors se contenter de croisements entre clones (hétérozygotes), mais dans ce cas, l'analyse des génotypes et du taux de recombinaison est plus délicate ; les descendance peuvent être des F2, des lignées recombinantes issues d'une F2 ou une descendance de backcross.

- Chez l'hévéa, la solution lignée recombinante n'est pas envisageable.

- L'emploi d'une F2 se heurte à deux difficultés :

- 1 pour obtenir suffisamment de descendants, le nombre d'autofécondations à réaliser atteint rapidement plusieurs milliers. Le taux de réussite des autofécondations est, semble-t-il, encore plus faible que celui des croisements manuels. Nous étudions actuellement le moyen de les réaliser en sac, pour réduire la lourdeur des manipulations.
- 2 pour le marquage des caractères agronomiques, il faut choisir la F1 telle que les parents soient le "plus distant" possible pour ces caractères. Le choix du clone à autoféconder repose donc sur le choix de ses parents, information pas toujours connue.

Pour ce dernier critère, d'après A. Clément-Demange, la meilleure combinaison parentale serait **PB 235 x PR 107**. Il existe en collection une descendance de légitimes (103 individus) d'un croisement de 1984. Ces arbres ne pourraient pas être autofécondés avant 5 ans.

D'autres croisements seraient également intéressants :

PB 260 x PR 107
GT 1 x RRIM 703
GT 1 x PB 260
PB 5/51 x PR 107

Pour les croisements GT 1 x RRIM 703 et PB 5/51 x PR 107, il existe des clones IRCA, descendants de ces combinaisons parentales, dont certains sont peut-être en état de produire des graines (à vérifier). Le choix de ces clones permettrait de disposer du matériel pour la cartographie, dès 1991.

- L'autre possibilité est la réalisation d'un backcross sur un individu F1 d'un croisement entre 2 clones intéressants : pour PB 235 x PR 107, ceci sera réalisable quand la collection de légitimes (de 1984) pourra fleurir.

L'inconvénient du backcross, par rapport à la F₂, est qu'il faudra impérativement réaliser un très grand nombre de pollinisations manuelles : en espérant obtenir 1 à 5 % de fécondations réussies, il faudra : $200/3 \text{ (x20 à x100)} = 1500 \text{ à } 6000$ pollinisations contrôlées.

Une solution consisterait à utiliser la descendance d'un croisement en backcross déjà réalisé ; il existe une descendance en collection à Bimbresso : PB 235 x IRCA 416 (1986, 110 légitimes) ; IRCA 416 provenant du croisement RRIM 623 x PB 235, il s'agit donc d'un rétrocroisement par PB 235. Cette descendance serait immédiatement disponible pour les analyses en RFLP, même si l'effectif est un peu juste.

Quelle que soit la solution adoptée, les individus analysés par RFLP doivent être étudiés parallèlement en champ de clones à très petite échelle (3 arbres par individu), pour la mesure des caractères agronomiques. Ces mesures pourraient être effectuées dans 4 à 5 ans pour les descendance déjà existantes ou dans 9 à 10 ans pour les croisements à réaliser.

1.3. TRANSFERT DE TECHNOLOGIE VERS L'IRCA COTE D'IVOIRE

1.3.1. Intérêt

Les besoins d'analyses par isozymes pour l'IRCA Côte d'Ivoire sont importants (voir ci-dessus 1.2.1.). Il serait intéressant de réaliser les manipulations sur place, en Côte d'Ivoire, pour plusieurs raisons :

- valorisation des acquis de l'IRCA-AGETROP, apport de technologie à l'IRCA-Côte d'Ivoire offrant une plus grande souplesse d'application aux sélectionneurs.
- possibilité de travailler à partir de matériel végétal frais : suppression de l'étape de lyophilisation, ce qui impliquerait une simplification de la méthode et une réduction des coûts.
- réduction du coût de main-d'oeuvre qui est le facteur déterminant du prix des manipulations à Montpellier.

1.3.2. Difficultés

Un premier problème est celui de l'approvisionnement en produits chimiques. Outre les délais, les taxes douanières sur ceux-ci risquent d'annuler le gain de coût sur la main d'oeuvre. A Montpellier, nous travaillons sur plusieurs procédés visant à augmenter le nombre d'individus analysables par gel d'électrophorèse afin de réduire le prix de revient par individu.

Deuxièmement, la création d'un laboratoire d'électrophorèse implique, en plus d'un financement d'équipement, le recrutement et la formation d'un technicien spécialisé à temps plein.

Pour estimer la faisabilité de cette entreprise, nous avons pris contact avec O. Sounigo, responsable d'un laboratoire d'analyse par isozymes à l'IRCC de Bingerville.

1.3.3. Visite du laboratoire électrophorèse de l'IRCC à Bingerville (A. Clément-Demange, M. Gnagne, H. Legnate, P. Besse, M. Seguin)

L'IRCC a créé, en Côte d'Ivoire, deux laboratoires d'électrophorèse d'isoenzyme, l'un à Divo, l'autre à Bingerville. M. Sounigo, sélectionneur

cacaoyer, est responsable de l'activité isozyme à Bingerville. Il est assisté par un technicien, E. Liade. O. Sounigo nous a fait visiter les parcelles d'expérimentation sur le cacaoyer et le laboratoire d'électrophorèse.

Le but principal de cette visite était d'établir une estimation des coûts d'équipement et de fonctionnement d'un laboratoire en Côte d'Ivoire.

Pour les deux laboratoires IRCC, le coût d'équipement a été de 13 millions de francs CFA, le matériel de base de chaque laboratoire est constitué de :

- 2 générateurs et 6 cuves de migration,
- 1 réfrigérateur-congélateur,
- 1 balance au mg + 1 balance au 1/10 de mg,
- 1 incubateur,
- 1 pH mètre,
- 1 agitateur chauffant,
- 1 pompe à vide,
- de la verrerie.

Pour le fonctionnement des deux laboratoires, le coût annuel, hors main-d'oeuvre, est de 2 millions de francs CFA. Mais, actuellement les besoins d'analyse (classification des variétés et légitimité des semences) et le temps d'occupation du laboratoire sont peu importants.

L'IRCC a estimé le prix des analyses, tout compris, facturables à 100-120 FF par plante, les besoins d'analyse de l'IRCA représenteraient au minimum 1000 individus par an, soit un coût de fonctionnement de plus de 5 millions de francs CFA. La part essentielle du prix de revient est imputable aux produits chimiques, pour lesquels les taxes douanières sont très lourdes. L'augmentation du nombre d'individus par gel permettra donc de réduire considérablement le prix de revient. Cependant, le fonctionnement peut paraître exorbitant, particulièrement dans les conditions économiques actuelles en Côte d'Ivoire.

1.3.4. Autres possibilités

La constitution d'un laboratoire à l'IRCA-Bimbresso a, de ce fait, paru impossible à A. Clément-Demange, d'autant plus qu'elle impliquerait le recrutement et la formation d'un technicien supplémentaire et une surcharge des programmes de l'Amélioration.

Trois possibilités s'offrent alors pour répondre aux besoins de l'IRCA :

- 1 une partie des analyses, celles concernant directement des travaux de recherche : identification de nouveaux clones, pollinisation libre... pourrait être réalisée à Montpellier sur feuilles lyophilisées ;
- 2 une partie pourrait également être sous traitée par l'IRCC. O. Sounigo est favorable à la rentabilisation de son laboratoire. Celui-ci ne tournant pas à plein temps, E. Liade pourrait effectuer des analyses pour l'IRCA. Ceci supposerait l'envoi en mission de P. Lebrun, pour un transfert rapide de son savoir faire sur l'hévéa (nous utilisons plus de systèmes enzymatiques différents qu'à l'IRCC).

Cette formule aurait l'avantage de permettre au service Amélioration de l'IRCA de réaliser rapidement, de façon assez souple, les analyses prioritaires. Cependant, elle ne constitue certainement pas la

meilleure valorisation pour l'IRCA, des acquis du laboratoire IRCA-AGETROP ;

- 3 une dernière solution est à l'étude, pour réaliser tout ou partie des analyses. Elle consisterait à mettre au point un "mini-laboratoire d'électrophorèse portable". P. Lebrun pourrait se rendre sur place, en Côte d'Ivoire, avec tout l'équipement et les produits nécessaires. Elle pourrait être aidée par des techniciens sur place (en particulier pour les prélèvements et les extractions des protéines). L'IRCA-AGETROP à Montpellier, travaille actuellement à la réalisation d'un tel laboratoire. Cette méthode pourrait être testée l'année prochaine, et aurait l'avantage d'être applicable à toutes les situations et à tous les organismes intéressés. Cette proposition fera l'objet d'un projet plus détaillé qui sera prochainement rédigé en relation avec D. Nicolas.

2. MISE AU POINT DU PROTOCOLE DE SECHAGE DES FEUILLES POUR LES RFLP

Un des objectifs de cette mission était de mettre au point une méthode fiable de séchage des feuilles, indispensable pour les travaux RFLP réalisés à Montpellier.

En effet, les feuilles séchées envoyées par la Côte d'Ivoire à Montpellier étaient pour la plupart de couleur marron, ceci ayant été directement corrélé avec un ADN dégradé (rapport mensuel AVRIL 90, Pascale Besse), et donc totalement inutilisables.

2.1. PRELEVEMENT - PROTOCOLE

Nous avons tout d'abord effectué deux prélèvements des 66 clones Wickham (1 feuille par clone), en utilisant la technique employée à Montpellier (liste des clones prélevés tableau 3).

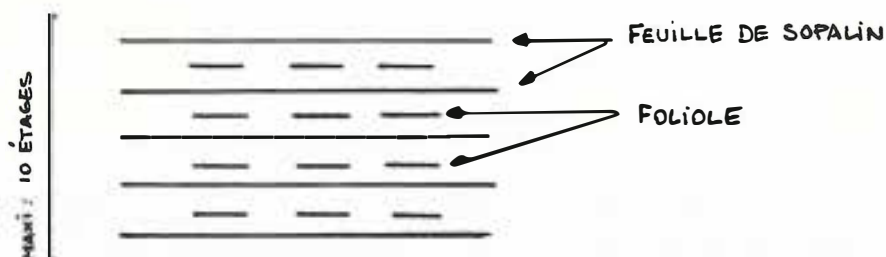
Pour le premier prélèvement, les feuilles ont été conservées dans la glace avant conditionnement, pour le deuxième, sans glace. Temps mis pour le prélèvement : une heure. Retour à la station et conditionnement une demi-heure après.

Protocole de conditionnement

Les feuilles mouillées (pluie, rosée), sont essuyées et les pétioles sont ensuite éliminés.

Pour chaque clone, les 3 folioles sont disposées côte à côte sur une feuille de Sopalin, et ainsi de suite en réalisant des étages successifs. Le nom du clone est inscrit sur le Sopalin.

Schéma : vue en coupe



ORIGINE	NUMEROS
MALAISE	
PB	24 , 86 , 217 , 235 , 252 , 254 , 260 , 330 , 5/51 , 28/59
RRIM	501 , 511 , 519 , 600 , 603 , 605 , 607 , 612 , 622 , 623
PIL	701 , 703 , 707 A/44 , B/16
JAVA	
GT	1
PR	107 , 226 , 228 , 261
SUMATRA	
AVROS	152 , 163 , 427 , 1328 , 2037
VIEINAM	
OY	1
TB	28
SUZ	14 , 35
IR	7 , 22 , 35
SRI-LANKA	
MK	3/2
NAB	15 , 17
RRIC	2 , 4 , 6 , 22 , 28 , 29 , 37 , 100 , 101 , 102 , 110 , 121
AFRIQUE	
Y	226/29
HARBEL	1 , 2 , 10 , 29 , 60 , 61

Tableau 3 : Liste des clones prélevés en feuilles séchées pour les RFLP.

Afin de maintenir le tout, le paquet est agrafé sur les côtés. Le séchage s'effectue dans une étuve à 40-45°C pendant 4 jours et 4 nuits ; puis les feuilles sont mises sous sachet plastique scellé hermétiquement (1 sachet par clone) et conservées dans une pièce climatisée.

RESULTAT Ces deux prélèvements ont donné de très bons résultats, et ce, sans problème particulier. Les feuilles obtenues sont de couleur verte et de consistance craquante. Un troisième prélèvement a été réalisé sur le même principe.

De retour à Montpellier, une extraction d'ADN a été effectuée à partir de ces feuilles (figure 2). On obtient un ADN non dégradé de très bonne qualité.

2.2. EXPERIENCES

Nous avons essayé de retrouver les erreurs ayant pu être commises qui ont conduit à l'obtention de feuilles marrons.

Le protocole de prélèvement réalisé jusqu'alors à Bimbresso différait de celui établi à Montpellier sur les points suivants :

- 1 utilisation de papier type "buvard" (whatman) au lieu du Sopalin ;
- 2 les feuilles des 66 clones étaient toutes empilées entre deux feuilles de papier whatman ;
- 3 une épaisse couche de sable a été déposée sur le dessus pour aplatiser les feuilles ;
- 4 l'étuve était à 60°C ;
- 5 les sachets contenant les feuilles, ont été, une fois scellés, percés de trous pour pouvoir les aplatiser.

Or, les points 1, 2 et 3 favorisent le maintien de l'humidité dans les feuilles, et induisent certainement leur brunissement. De plus, les feuilles ne supportent peut-être pas une température de 60°C. Le fait de percer les sachets scellés contribue certainement à une reprise de l'humidité.

Ainsi, nous avons testé tous ces paramètres pour savoir lequel ou lesquels induisent un brunissement des feuilles, ainsi que quelques uns supplémentaires qui nous ont semblé importants.

Les expériences ont été réalisées sur des feuilles d'état différent :

- très bon état
- feuilles tachées
- feuilles tachées et abîmées

en prenant deux clones par type de feuille.

Le témoin Ø est représenté par le premier prélèvement (= conditions idéales).

Différents paramètres sont testés :

- prélèvement effectué sans glace ;
- temps écoulé jusqu'au conditionnement (4h au lieu d'1h) ;

Figure 1. Extraction ADN - Expériences séchage

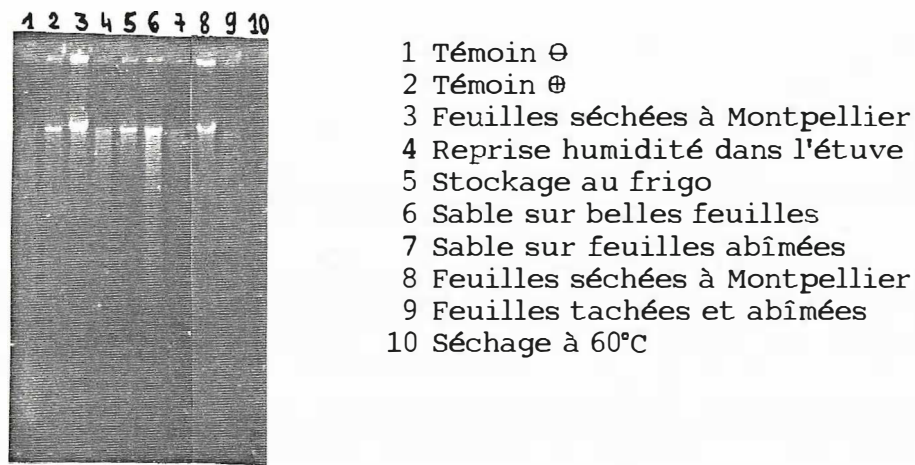
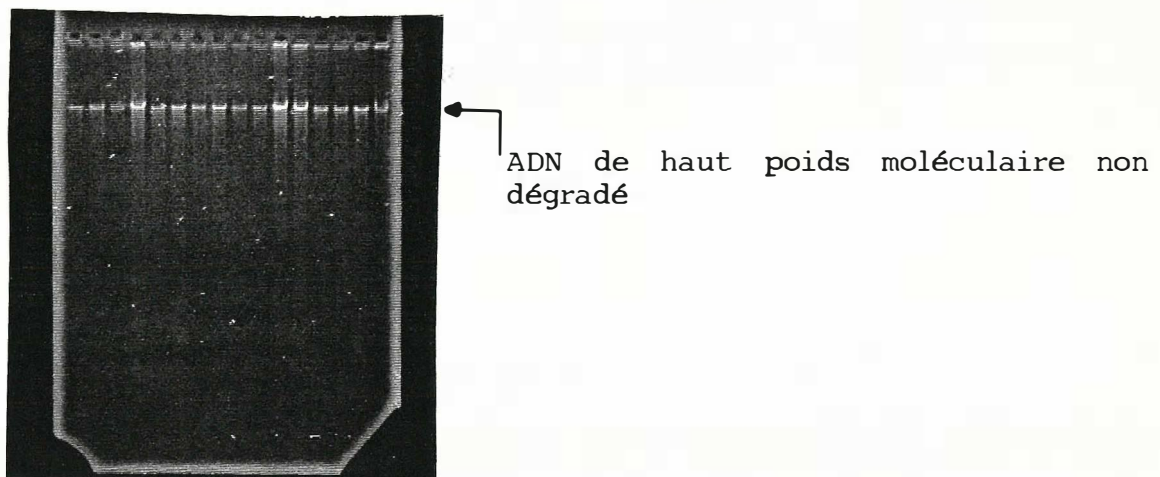


Figure 2. Extraction ADN feuilles clones Wickham séchées en Côte d'Ivoire



- feuilles non essuyées ;
- ajout de sable pendant le séchage ;
- utilisation de papier whatman et empilement des feuilles ;
- température de séchage (60°C) ;
- durée du séchage insuffisante (1 jour) ;
- stockage (réfrigérateur, pièce climatisée, sachets percés de trous).

Pour chaque expérience, un seul paramètre est modifié par rapport au témoin Θ .

Le témoin Θ est représenté par toutes les erreurs cumulées.

Tous les échantillons ont été rapportés à Montpellier et testés pour la qualité de leur ADN.

2.3. RESULTATS - DISCUSSION

Le témoin Θ nous a permis de reproduire le motif : feuilles marrons. L'ADN obtenu à partir de ce témoin Θ est entièrement dégradé (puits 1, figure 1).

Comme nous l'avons vu, le témoin Θ donne des feuilles qui restent vertes, et l'ADN obtenu est de très bonne qualité (figure 2, et puits 2 figure 1), comme pour les feuilles séchées à Montpellier (figure 1 puits 3 et 8). Les différentes expériences réalisées permettent de savoir quelle(s) étape(s) du conditionnement des feuilles sont importantes.

2.3.1. Etat des feuilles prélevées

Il est indispensable de prélever des feuilles les plus belles possible. Elles résistent beaucoup mieux aux mauvais traitements. En effet, pour toutes les expériences réalisées, quand les belles feuilles restent vertes, les feuilles plus abîmées commencent à brunir (puits 9, figure 1).

2.3.2. Paramètres n'influençant pas la qualité des feuilles ni de l'ADN

- conservation des feuilles lors du prélèvement sans glace ;
- temps écoulé avant conditionnement : 4 h ;
- feuilles non essuyées ;
- stockage au réfrigérateur (puits 5 figure 1) ou dans une pièce climatisée.

Ces différents facteurs n'entraînent aucune modification de la qualité des feuilles séchées. Elles restent vertes et leur ADN est de bonne qualité (type témoin Θ).

2.3.3. Paramètres n'influençant pas la qualité des feuilles mais induisant une dégradation de l'ADN

- ajout de sable pendant le séchage à 40°C ;
- durée de séchage insuffisante ;
- sachets percés de trous.

Ces trois paramètres n'influent pas sur l'état externe des feuilles, qui restent de couleur verte. Toutefois, l'ADN obtenu est dégradé (puits 6 et 7 figure 1).

De plus, lorsque le séchage est insuffisant (feuilles non craquantes) ou les sachets percés, les feuilles ont tendance à moisir.

2.3.4. Paramètres entraînant brunissement des feuilles et dégradation ADN

- séchage à 60°C ;
- utilisation de papier Wathman et empilement des feuilles.

Ces paramètres sont très importants. Dans tous les cas, ils induisent un brunissement total (séchage à 60°C) ou partiel (empilement des feuilles : brunissement au niveau des zones de contact). L'ADN obtenu est totalement dégradé (puits 10 figure 1).

2.4. CONCLUSION

Il faut donc surtout **NE PAS**

- dépasser 40°C pour le séchage ;
- empiler les feuilles les unes sur les autres ;
- employer du sable ;
- percer des trous dans les sachets une fois scellés.

Il faut bien attendre (environ 4 jours) que les feuilles soient bien sèches et craquantes, et une fois qu'elles sont sorties de l'étuve, les mettre immédiatement en sachets scellés pour éviter toute reprise d'humidité (des feuilles bien sèches laissées sur la pailleasse redeviennent molles en moins d'une demi-heure).

De plus, les étuves n'étant pas ventilées, il vaut mieux :

- choisir une grande étuve ;
- ouvrir la porte de l'étuve trois fois par jour pour laisser sortir l'humidité ;
- éviter d'ajouter quelque chose d'humide dans l'étuve pendant le séchage (par exemple de nouvelles feuilles fraîchement cueillies).

Ceci n'influe pas sur la couleur des feuilles, mais l'ADN obtenu est de moins bonne qualité (puits 4 figure 1).

En respectant impérativement les conditions ci-dessus, il est donc très aisé de réaliser un séchage correct des feuilles permettant ensuite d'obtenir un ADN de bonne qualité. Un protocole détaillé, établi suite à ces expériences, c'est à dire conforme au témoin Θ , a été laissé à Bimbresso.

3. VISITE DES AUTRES LABORATOIRES IRCA

3.1. PHYSIOLOGIE

R LACROTTE : visite sur la plantation des essais "physiologie"

1 Gestion du panneau de saignée

- 1/2 saignée des panneaux,
- gestion pour plantations villageoises,
- saignée remontante.

2 Potentiel de production

- ouverture du panneau de saignée,
- rythme de saignée.

3 Stimulation

- fréquence et mode d'application de l'Ethrel.

4 Diagnostic Latex

- prélèvement-protocole en plantation,
- transfert actuel chez les planteurs.

5 Gestion

- organisation du travail des saigneurs

E. SERRES : visite du laboratoire Physiologie

1 Diagnostic Latex

- aspects théoriques,
- typologie clonale.

2 Encoche sèche

- voie pathogène,
- approche pluridisciplinaire en collaboration avec D. Despréaux,
- hypothèse du stress physiologique.

Rencontre avec les étudiants ivoiriens préparant leur thèse en biologie moléculaire au laboratoire de physiologie :

DIAN Kouadio recherche de variations caractéristiques de l'expression des gènes en relation avec le phénomène de l'encoche sèche.

KOFFI Kouablan typologie clonale par l'étude de la variabilité de l'expression des gènes en relation avec la productivité en caoutchouc.

Ces deux étudiants ont la même approche méthodologique, utilisant ou souhaitant utiliser les mêmes techniques de biologie moléculaire et de biochimie des protéines ; en particulier :

- 1 électrophorèse mono- ou bidimensionnelle des protéines,
- 2 électrophorèse d'ARN et hybridation (Northern) à l'aide de sondes génomiques (fragments d'ADN nucléaire) de gènes connus ou de cDNA.

Après identification d'un (ou plusieurs) gène intéressant, Koffi souhaiterait que soit réalisée l'analyse génétique de ces séquences par la technique des RFLP.

Cependant, cet aspect devrait intervenir théoriquement comme étape complémentaire, en dehors du cadre de sa thèse.

Ces deux étudiants terminent leur première année de thèse. Ils travaillent à la mise au point des techniques et utilisent surtout pour l'instant, l'électrophorèse des protéines. Nous leur avons proposé un échange d'informations techniques et bibliographiques en électrophorèse bidimensionnelle (M. Seguin) et en RFLP (P. Besse). Un exemplaire de la thèse de M. Seguin a été envoyé à Bimbresso. Dian et Koffi sont aidés par E. Serres et R. Lacrotte au niveau du fonctionnement du laboratoire de physiologie de l'hévéa.

Cependant, l'encadrement scientifique et les compétences en biologie moléculaire sont dûs au Pr Sangaré de l'Université d'Abidjan. Celui-ci était en mission aux Etats Unis au moment de notre séjour en Côte d'Ivoire, nous n'avons pu le rencontrer.

Les recherches entreprises par les deux thésards, au sein du laboratoire de physiologie de l'IRCA, font appel en partie aux mêmes techniques. Il convient de bien définir le domaine d'application de ces techniques, pour que puissent s'établir des échanges au niveau méthodologique sans qu'il y ait une concurrence interne entre programmes IRCA.

Les recherches des deux étudiants sont du domaine de la Physiologie Moléculaire ; elles visent l'identification de variations significatives de l'expression des gènes en relation, soit avec une maladie, soit avec la variabilité génétique (typologie clonale).

L'analyse du polymorphisme génétique de gènes impliqués dans des processus physiologiques est effectivement une recherche complémentaire importante. Il nous paraît intéressant que les éventuels gènes d'intérêt physiologique, puissent être étudiés en parallèle par le laboratoire IRCA-AGETROP qui pourrait les intégrer dans l'analyse globale de la variabilité génétique et dans la carte génétique de l'hévéa qu'il a entreprises. Les différentes équipes de l'IRCA pourraient ainsi collaborer très efficacement.

3.2. TECHNOLOGIE

J.C. LAIGNEAU : Présentation générale du programme technologie

- 1 évolution du marché et des exigences des acheteurs au niveau spécification ;
- 2 nécessité de définir les critères de qualité du latex avant usinage et paramètres d'usinage pour obtention d'un caoutchouc de spécification définie ;
- 3 à terme, introduction de la qualité technologique comme critère de sélection des clones ;
- 4 orientations de recherche, 3 pôles interdépendants :
 - typologie clonale des propriétés technologiques miniaturisation des méthodes,
(démonstration chaîne HPLC/Spectro IR automatisée par A. Lemoine),
 - procédés d'usinage : paramètres de viscosité, vulcanisation et oxydabilité,
 - mise en oeuvre du caoutchouc,
(IRAP, Le Mans).

A. LEMOINE : présentation des autres activités

- 1 caoutchouc liquide : présentation du programme, visite de l'unité pilote,
- 2 programme de recherche de nouveaux dérivés (adhésifs, époxy).

3.3. PHYTOTECHNIE

J. KELI : Exposé des différents programmes

1 établissement des plantations :

- choix et préparation du terrain et du matériel végétal,
- densité de peuplement,
- systèmes racinaires,
- acclimatation des vitroplants (visite de la serre d'acclimatation avec C. Drenou : exposé des différentes étapes : acclimatation, reprise de croissance, endurcissement).

2 entretien des plantations :

- désherbages chimique (Arsenal) et biologique (Pueraria..)
- problème de l'épiphyte parasite Loranthus

3 cultures associées : temporaires et permanentes

4 relations sol/plante/climat : nutrition minérale (engrais) et comportement en zones marginales.

J. KELI, M. KOUASSI : visite de la plantation

1 essais désherbants avec des plantes de couverture,

2 parcelles en cultures associées,

3 observation des systèmes racinaires,

4 parcelle d'acclimatation microboutures : comparaison greffés/microboutures sur jumeaux.

★

★ ★

CONCLUSION - REMERCIEMENTS

Cette mission avait plusieurs objectifs précis qui ont été atteints. Elle a eu, pour nous, un rôle global très positif, en nous faisant découvrir les activités de recherche et de coopération de l'IRCA. Elle a eu également des conséquences précises (1) en nous garantissant un approvisionnement en matériel végétal pour les expériences de biologie moléculaire (2) en nous permettant de définir un programme de recherche en commun avec l'équipe de l'Amélioration en Côte d'Ivoire (3) en ouvrant des perspectives nouvelles de valorisation de la technique des isozymes.

Le bon déroulement de la mission a été rendu possible grâce à l'accueil et à la disponibilité des chercheurs de Bimbresso que nous remercions vivement. Nous remercions plus particulièrement A. Clément-Demange pour l'organisation parfaite de notre séjour, ainsi que M. Kone qui nous a facilité toutes les démarches administratives et M. Banchi, directeur de l'IRCA Côte d'Ivoire, d'avoir permis cette mission de trois semaines.

* *
*

ANNEXES

Présentation des techniques RFLP

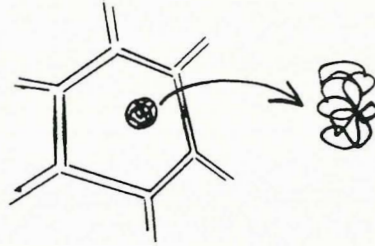
R.F.L.P

RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM.

→ RÉVÉLER LA DIVERSITÉ DES PLANTES AU NIVEAU DE L'ADN

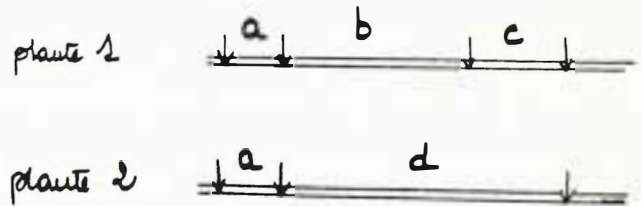
PLUSIEURS ÉTAPES

- EXTRACTION DE L'ADN

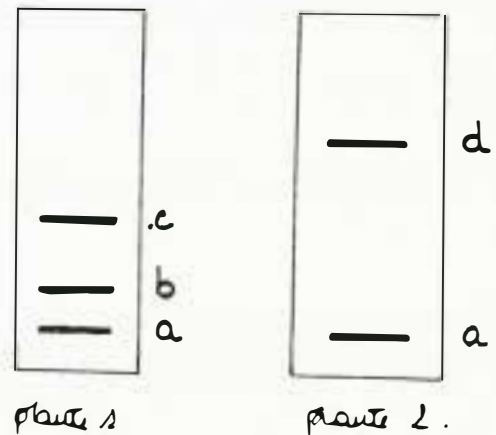


- DIGESTION DE L'ADN PAR UNE ENZYME DE RESTRICTION

Coupe l'ADN à des sites spécifiques.

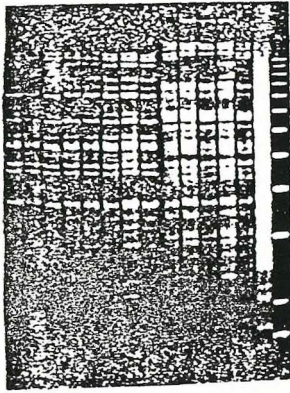


- SÉPARATION DES FRAGMENTS D'ADN
par électrophorèse (gel d'agarose)



APRES DIGESTION ENZYMATIQUE

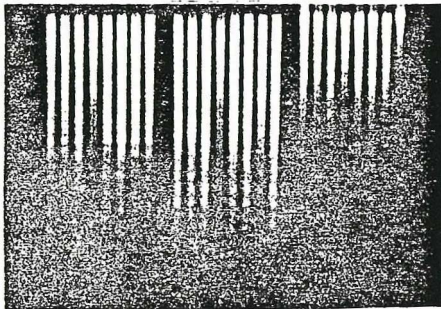
ADN Cytoplasmique (chloroplastique ou mitochondrial)



→ VISUALISATION DIRECTE DES BANDES

car ADN petite taille

ADN Nucleaire



(Hévéa)

ADN grande taille

→ très grand nombre de fragments

→ pas de bande directement visualisable mais obtention d'un voile continu.



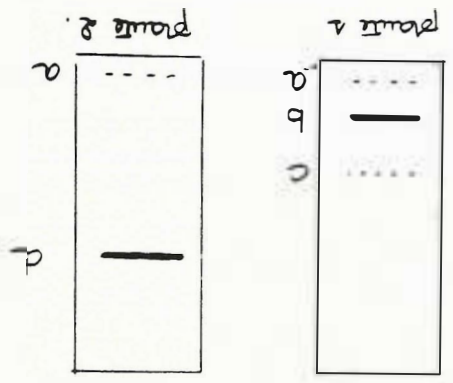
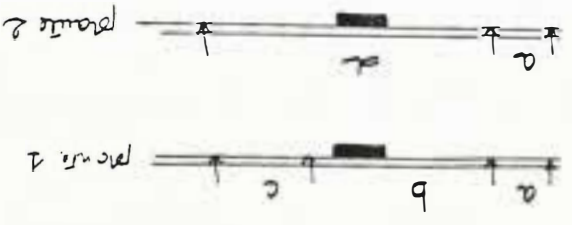
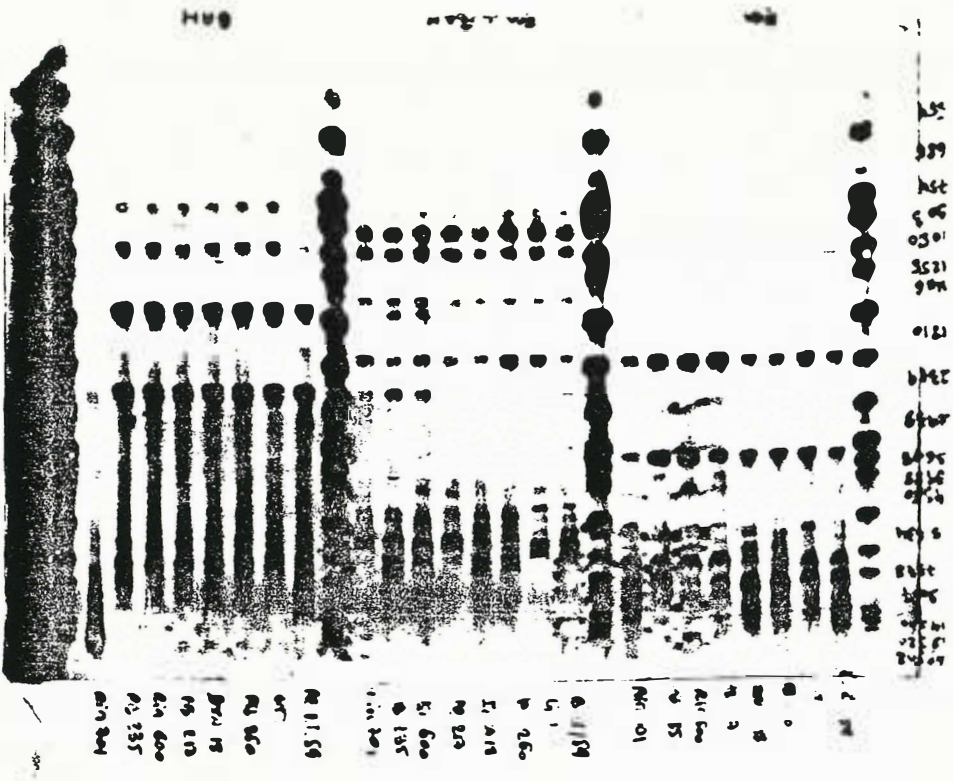
Recours à des SONDES pour détecter le polymorphisme

SONDE : fragment d'ADN isolé à partir

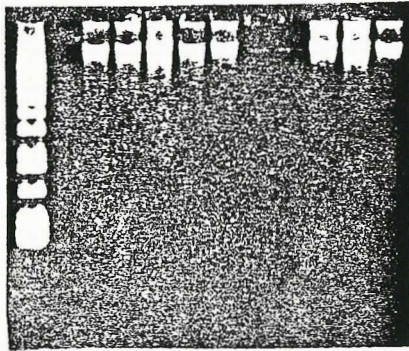
- de la plante étudiée (sonde HOMOLOGUE)
- nécessite utilisation BANQUE (cf partie cartographie)
- d'autres espèces (sonde HÉTÉROLOGUE)

MARQUAGE SONDES FROIDES
RADIOACTIVES

Exemple : *Nevea brachycephala*
 Hybridation avec une sonde d'ADN ribosomique du bœuf.



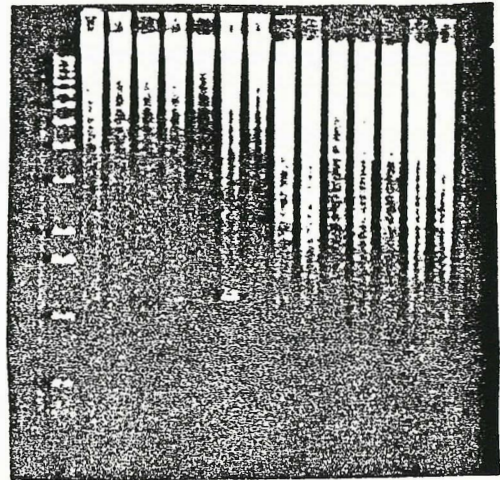
EXTRACTION ADN
Feuilles séchées à Montpellier



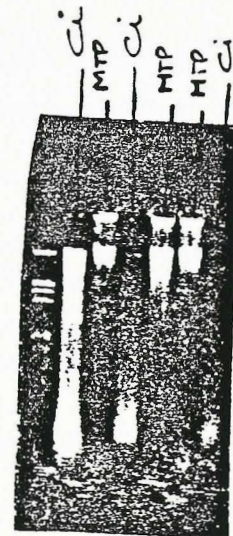
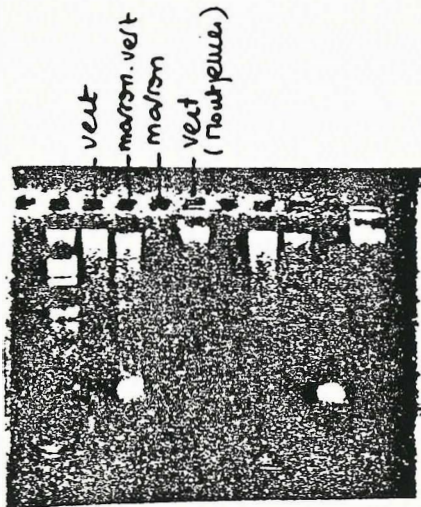
ADN digéré

BamHI

EcoRI



EXTRACTION ADN - Qualité de l'ADN selon état matériel



les marqueurs RFLP sont :

- STABLES VIS À VIS ENVIRONNEMENT
- STABLES QUEL QUE SOIT L'ORGANE OU LE STADE PHYSIOLOGIQUE DE LA PLANTE
- SEGREGATION MENDELIENNE (ADN NUCLÉAIRE)
- COORDINANCE DES MARQUEURS
- NOMBRE QUASI ILLIMITÉ DE MARQUEURS
- ACCÈS À LA TOTALITÉ DU GÉNOME
- DIVERSITÉ RÉVÉLÉE POUR LES SÉQUENCES CODANTES ET NON CODANTES
- GRAND NOMBRE POSSIBLE D'ALLÈLES
- POSSIBILITÉ DE TRAVAILER SUR MATÉRIEL VÉGÉTAL SÈCHÉ.
- CÔÛT ÉLEVÉ

APPLICATIONS.

1 POLYMORPHISME (P. BESSE)

- IDENTIFICATION VARIÉTALE
"Carte d'identité génétique"
Protection droits sélectionneur.
- ÉTUDE DU POLYMORPHISME
- CALCUL DES DISTANCES GÉNÉTIQUES

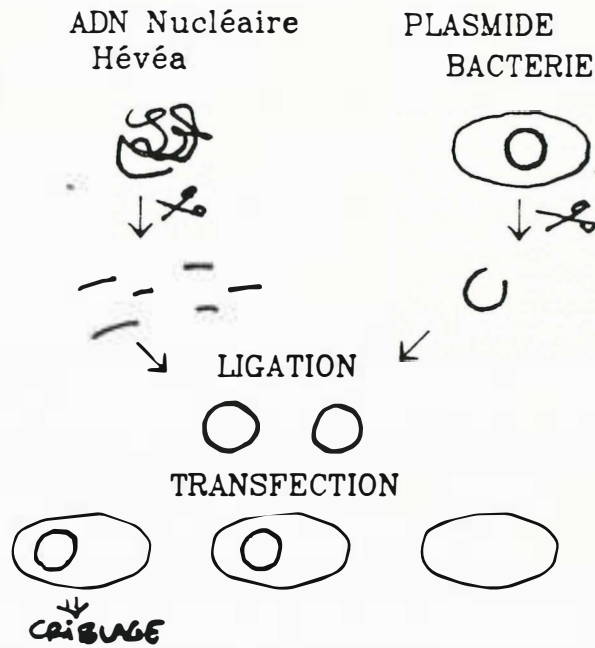
⇒ Indispensable dans tout programme de sélection

en AMONT	Gestion Variabilité Identification
en AVAL	Suivi et Vérification des Croisements

3 - RFLP - CARTOGRAPHIE (N. SEGUIN)

1. ETABLISSEMENT D'UNE BANQUE GENOMIQUE D'HEVEA

M. SEGUIN
P. BESSE



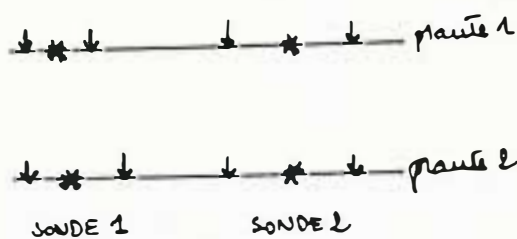
chaque clone bactérien contient 1 sonde particulière

2. TRI DE LA BANQUE

→ sondes uniques

→ sondes répétées

→ sondes uniques POLYMORPHES



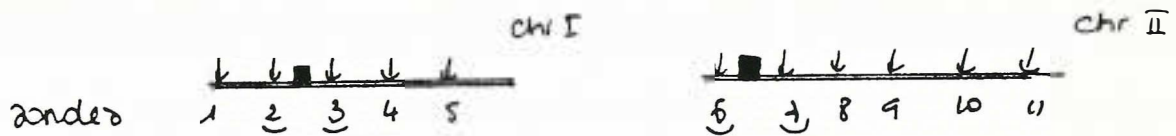
3. LOCALISER LES MARQUEURS RFLP (200.300)

par étude des ségrégations (croisements contrôlés)

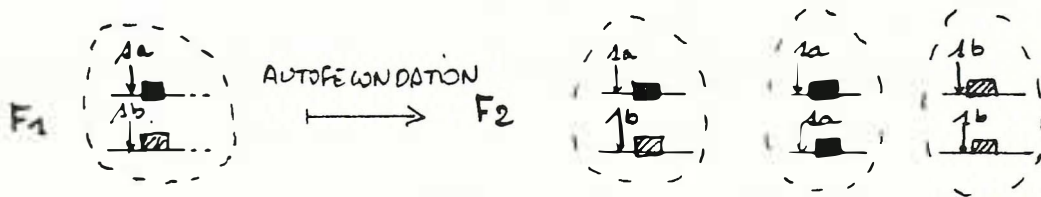


4. ETUDE PARALLÈLE sur les mêmes descendance de la ségrégation des CARACTÈRES à sélectionner

5. Mise en évidence des liaisons génétiques entre marqueurs RFLP et caractères recherchés.



6. UTILISATION AU COURS DE LA SÉLECTION



LA PRÉSENCE DU MARQUEUR RFLP
REFLÈTE CELLE DU CARACTÈRE ■

(1a)